

## (C) WPI / DERWENT

AN - 1989-064999 [28]  
 AP - JP19870173549 19870710; JP19870173549 19870710; [Previous Publ. J01016799 ]  
 CPY - TOXN  
 DC - B04  
 FS - CPI  
 IC - A61K37/24 ; A61K38/22 ; C07K1/00 ; C07K3/00 ; C07K7/10 ; C07K14/635 ; C07K99/00  
 MC - B04-B02D3 B04-C01  
 M1 - [01] D011 D601 F014 F521 G010 G100 H1 H100 H101 H181 H182 H4 H401 H481 H5 H598 H8 H9 J0 J011 J012 J1 J171 J172 J3 J371 K0 L2 L250 M210 M211 M271 M280 M281 M311 M312 M313 M314 M315 M321 M332 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391 M423 M431 M510 M511 M520 M521 M530 M531 M540 M620 M782 M903 P624 V624 V901 V902 V917 V921; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
 M2 - [02] H4 H402 H482 H8 J0 J012 J1 J172 M280 M312 M321 M332 M344 M349 M381 M391 M416 M431 M620 M782 M903 M904 M910 Q622; R00540-M; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
 PA - (TOXN ) TOYO JOZO KK  
 PN - JP1016799 A 19890120 DW198909 004pp  
 - JP2505812B2 B2 19960612 DW199628 C07K14/635 003pp  
 PR - JP19870173549 19870710  
 XA - C1989-028850  
 XIC - A61K-037/24 ; A61K-038/22 ; C07K-001/00 ; C07K-003/00 ; C07K-007/10 ; C07K-014/635 ; C07K-099/00  
 AB - J01016799 Stabilised human parathyroid hormone peptide (1-34) (h-PTH (1-34)), is prepd. from volatile organic acid salt of h-PTH (1-34) by removing the volatile organic acid as much as possible, next, by dissolving it into 1.8-25 wt.% of tartaric acid contg. aq. soln., then by lyophilising the obtd. soln. to prepare the stabilized h-PTH (1-34) compsn..  
 - USE/ADVANTAGE - The compsn. is more thermostable than common h-PTH (1-34) acetate. When these are stored at 65 deg. C for 3 weeks, the residual activity (%) of this compsn. is 85.1, while that of the acetate is 72.6. (Dwg.0/O)  
 CN - R00540-M  
 DRL - 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
 IW - STABILISED HUMAN PARATHYROID HORMONE PEPTIDE COMPOSITION PREPARATION  
 CORRESPOND VOLATILE ORGANIC ACID DISSOLVE AQUEOUS TARTARIC ACID  
 SOLUTION LYOPHILISE  
 IKW - STABILISED HUMAN PARATHYROID HORMONE PEPTIDE COMPOSITION  
 PREPARATION  
 CORRESPOND VOLATILE ORGANIC ACID DISSOLVE AQUEOUS TARTARIC ACID  
 SOLUTION LYOPHILISE  
 NC - 001  
 OPD - 1987-07-10  
 ORD - 1989-01-20  
 PAW - (TOXN ) TOYO JOZO KK  
 TI - Stabilised human parathyroid hormone peptide compsn. - prepd. from corresp. volatile organic acid dissolved in aq. tartaric acid soln. and lyophilised

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-16799

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和64年(1989)1月20日

C 07 K 7/10

A 61 K 37/24

C 07 K 3/00

// C 07 K 99:00

8318-4H

8615-4C

8318-4H

審査請求 未請求 発明の数 2 (全4頁)

⑬ 発明の名称 h-P T H (1-34) 組成物およびその製造法

⑯ 特 願 昭62-173549

⑰ 出 願 昭62(1987)7月10日

⑱ 発 明 者 森 田 香 静岡県田方郡修善寺町柏久保486-4

⑲ 発 明 者 野 田 俊 治 静岡県田方郡伊豆長岡町小坂908-5

⑳ 出 願 人 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

明 細 書

1. 発明の名称

h-P T H (ノ-34) 組成物およびその  
製造法

2. 特許請求の範囲

1). ヒト副甲状腺ホルモンペプチド(ノ-34)  
揮発性有機酸塩から存在していた揮発性有機酸  
をできるだけ除去したヒト副甲状腺ホルモンペプ  
チド(ノ-34)を全量に対し酒石酸の量が1.8  
~2.5重量部の範囲となるように酒石酸を含有さ  
せた水溶液に溶解し、得られた溶液を凍結乾燥し  
てなるヒト副甲状腺ホルモンペプチド(ノ-34)  
安定化組成物。

2). ヒト副甲状腺ホルモンペプチド(ノ-34)  
揮発性有機酸塩から存在していた揮発性有機酸  
をできるだけ除去したヒト副甲状腺ホルモンペプ  
チド(ノ-34)を全量に対し酒石酸の量が1.8  
~2.5重量部の範囲となるように酒石酸を含有さ  
せた水溶液に溶解し、得られた溶液を凍結乾燥す  
ることを特徴とするヒト副甲状腺ホルモンペプチ

ド(ノ-34)安定化組成物の製造法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、ヒト副甲状腺ホルモン(以下h-P  
T Hと称することがある)活性を有する新規なヒ  
ト副甲状腺ホルモンペプチド(ノ-34)(以下、  
h-P T H(ノ-34)と称する)安定化組成物  
およびその製造法に関する。

[従来の技術]

h-P T H(ノ-34)は、式

H-Ser-Val-Ser-Glu-Ile  
-Gln-Leu-Met-His-Asn  
-Leu-Gly-Lys-His-Leu  
-Asn-Ser-Met-Glu-Arg  
-Val-Glu-Trp-Leu-Arg  
-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp  
-Val-His-Asn-Phe-OH

で示され、ペプチド固相法により合成され、カ  
ラムクロマトグラフィーにより分離精製される段階  
で、ゲル濾過により脱塩する場合、0.1M酢酸で

溶出され、凍結乾燥により精製品が得られることは公知である〔Hoppes-Seyler's Z. Physiol. Chem., Vol. 355, 4/5~42/, April /774〕。

〔発明が解決しようとする問題点〕

上記の公知の方法により製造されるh-PTH(ノ-34)は、精製の段階でゲル濾過により脱塩する場合、O/M酢酸で平衡化したゲル濾過剤にチャージされ、O/M酢酸で溶出されるため、少なくとも酢酸塩が形成された形で精製品として採取される。

しかしながら、この精製品の酢酸含量は製造ロットにより大きく変化して一定の酢酸含量を有する製品を得ることは困難であり、しかも65℃で3週間の放置でh-PTH活性が約30%も低下するという欠点があった。

上記の精製の段階で酢酸の代りに他の揮発性有機酸、例えば蟻酸で溶出して得られる精製品も前記酢酸塩と同様の欠点を有することを知った。

〔問題を解決するための手段〕

意味し、理論的にはh-PTH(ノ-34)/モルに対しノ-7モルの範囲の揮発性有機酸を有し得る。上記揮発性有機酸塩中には、酸付加塩を形成するための揮発性有機酸以外に、凍結乾燥によつて除去されない揮発性有機酸も混入し得るので、酸付加塩の形成に関与しない揮発性有機酸の混入した酸付加塩も本発明のh-PTH(ノ-34)揮発性有機酸塩に包含される。また、h-PTH(ノ-34)を精製する段階で、2種以上の揮発性有機酸で溶出を繰り返した場合には、得られる精製品は2種以上の揮発性有機酸塩を形成し得るので、この混合酸付加塩も本発明のh-PTH(ノ-34)揮発性有機酸塩に包含される。

本発明で定義した、存在していた揮発性有機酸をできるだけ除去したh-PTH(ノ-34)とは、前記揮発性有機酸塩を陰イオン交換樹脂で処理して揮発性有機酸をできるだけ除去したh-PTH(ノ-34)を意味するが、揮発性有機酸含量測定の種類限界以上から0.5重量%程度まで揮発性有機酸が含まれていてもよい。

そこで、本発明者らは、上記の問題を解決すべく種々研究を続けた結果、上記のh-PTH(ノ-34)精製品を陰イオン交換樹脂で処理して、酢酸塩を形成することにより存在していた酢酸をできるだけ除去し、次いで一定の酒石酸含量を含む水溶液に溶解して凍結乾燥すると、得られた凍結乾燥品は製造ロットに関係なく一定の酒石酸含量を有するだけでなく、従来の精製品より65℃での安定性がより優れていることを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明は、h-PTH(ノ-34)揮発性有機酸塩から存在していた揮発性有機酸をできるだけ除去したh-PTH(ノ-34)を全量に対し酒石酸の量がノ.8~2.5重量%の範囲となるように酒石酸を含有させた水溶液に溶解し、得られた溶液を凍結乾燥してなるh-PTH(ノ-34)安定化組成物およびその製造法である。

本発明で定義したh-PTH(ノ-34)揮発性有機酸塩とは、h-PTH(ノ-34)と揮発性有機酸、例えば酢酸、蟻酸などとの酸付加塩を

上記の陰イオン交換樹脂としては、Dowex WGRが望ましいが、これに限定されることはなく、他の公知の陰イオン交換樹脂も使用できる。

上記の陰イオン交換樹脂による処理は、h-PTH(ノ-34)揮発性有機酸塩をできるだけ少量の水に溶解した溶液をOH<sup>-</sup>型の陰イオン交換樹脂のカラムにチャージし、水で溶出することにより行われる。各フракシヨンのh-PTH(ノ-34)は、280nmにおけるUV吸収により確認し、h-PTH(ノ-34)を含有するフракシヨンを凍結乾燥することにより、揮発性有機酸をできるだけ除去したh-PTH(ノ-34)が得られる。

次に、揮発性有機酸をできるだけ除去したh-PTH(ノ-34)から本発明のh-PTH(ノ-34)安定化組成物を調製するのであるが、この調製は前記h-PTH(ノ-34)を全量に対し酒石酸の量がノ.8~2.5重量%の範囲となるように酒石酸を含有させた水溶液に溶解し、次いで得られた溶液を凍結乾燥することにより行われる。

上記調製の結果、 $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ は酒石酸との酸付加塩を形成するが、理論的には $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ ノセルに対し0.5~9セルの範囲の酒石酸を有し得る。しかしながら、酸付加塩の形成に関与しない酒石酸が混入し得るので、酒石酸との酸付加塩は勿論のこと、酸付加塩の形成に関与しない酒石酸の混入した酸付加塩も、本発明の $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 安定化組成物に含まれる。

#### (発明の効果)

このようにして得られた $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 安定化組成物の熱安定性について述べる。

#### (1) 試験方法

公知の方法により得られた $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 酢酸塩および実施例ノで得られた本発明の $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 安定化組成物を各々約300 $\mu\text{g}$ を秤取し、サンプルチューブに入れ密栓した後、65℃に放置し、0、1、2、3週間後に取り出し、各試料( $n=2$ )を0.1MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH2.0)溶液で500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となる

よう溶解し、このサンプルを次の条件による高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により残存する $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 量を求めた。

#### <HPLC条件>

HPLC装置：島津LC-4A

カラム：4mm i.d.  $\times$  50mm, Nucl.

eoasil C<sub>18</sub>

移動相：0.1% TFA-アセトニトリル(アセトニトリルを20分間に20→40%に変化させるグラジエント法)

流速：1ml/分

検出：UV 280nm

試料：500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液25 $\mu\text{L}$

#### (2) 測定結果

0週のピーク面積を100%として各々の試料の残存活性の平均値を求めた結果は第1表の通りである。

第1表

	残 存 活 性 (%)			
	0週	1週	2週	3週
公 品	100	87.6	78.2	72.6
本発明品	100	90.0	86.3	85.1

以上の結果から、本発明の $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 安定化組成物は、公知の $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 酢酸塩より65℃での熱安定性がより優れていることを示すものである。

#### (実施例)

次に、参考例および実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

尚、製品中の酢酸および酒石酸含量の測定は、次の条件によるHPLCにより行つた。

#### <HPLC条件>

HPLC装置：L-5000 HITACHI  
HPLC

カラム：Ultron PS-80H 8mm  
i.d.  $\times$  300

移動相：水(pH2.0、HClO<sub>4</sub>による)

流速：1.0ml/分

検出：UV 210nm

試料：5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液30 $\mu\text{L}$

#### 参考例

公知の方法で得た $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 酢酸塩20 $\mu\text{g}$ をできるだけ少量の水に溶解し、水で平衡化したDowex WGR(OH<sup>-</sup>型)のカラム(2.5 $\times$ 10cm)にチャージし、水で溶出した。各フラクションをUV 280nmで確認し、 $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ を含むフラクションを集めて凍結乾燥して $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ の凍結乾燥品を得た。

上記の操作を5回行つたが、 $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ の収率は86.0~94.0%であつた。

原料の $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 酢酸塩および得られた $\text{h-PTH}(\text{ノ-34})$ 凍結乾燥品の酢酸含量を測定すると、第2表の通りであつた。

第2表

	酢酸含量
原料(酢酸塩)	297%